



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2011 00910

(22) Data de depozit: 16.09.2011

(41) Data publicării cererii:
29.06.2012 BOPI nr. 6/2012

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• MOLDOVAN LUCIA,
BD. CONSTRUCTORILOR NR.24, BL.19,
SC.A, AP.13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CRĂCIUNESCU OANA,
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A1,
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;

• TRIF MIHAELA, STR.PROMETEU NR.29,
BL.16G, SC.3, AP.34, SECTOR 1,
BUCUREȘTI, B, RO;
• ZĂRNESCU OTILIA, BD. IULIU MANIU
NR.59, BL.10, SC.1, AP.17, SECTOR 6,
BUCUREȘTI, B, RO;
• MOISEI MAGDALENA,
STR.MATEI BASARAB NR. 94, BL.L120,
SC.B, AP.23, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• GASPAR ALEXANDRA, ȘOS. COLENTINA
NR. 55, BL. 83, SC. 1, AP. 17, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) MATERIAL BIOCOMPATIBIL POROS CU ROL ÎN
STIMULAREA REGENERĂRII CARTILAJULUI ȘI PROCEDEU
DE OBȚINERE

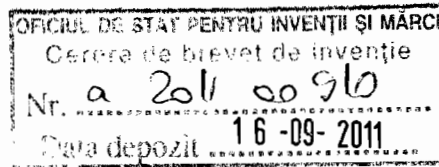
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un produs sub formă de material poros, biocompatibil și resorbabil, și la un procedeu de obținere a acestuia. Produsul conform invenției este constituit din 30...40% lipozomi cationici, 1...10% extract de arnică și/sau urzică, conținând 5...20 mg/ml polifenoli și/sau 1...10 mg/ml polizaharide, 30...45% colagen acido-solubil de tip II și 20...30% sulfat de condroitin, părțile fiind exprimate în greutate. Procedeu conform invenției constă din amestecarea a 30...60 părți compoziție I, constând dintr-o soluție formată din 5...15% lipozomi în care s-au înglobat 1...10% extract de plante, cu 40...70 părți compoziție II, constând din

50...70% soluție vâscoasă de colagen cu concentrație 5...20 mg/ml, și 30...50% soluție apoasă de sulfat de condroitin de concentrație 10...20 mg/ml, cele două compoziții se amestecă, cu agitare puternică, timp de 30...60 min, gelul rezultat se liofilizează la o temperatură de -20...-40°C, se usucă la o temperatură de 20...30°C, timp de 36...72 h, materialul poros rezultat se taie la dimensiuni uniforme și se sterilizează cu radiații gamma.

Revendicări: 2





MATERIAL BIOCOMPATIBIL POROS CU ROL IN STIMULAREA REGENERARII CARTILAJULUI SI PROCEDEU DE OBTINERE

Lucia Moldovan, Oana Craciunescu, Mihaela Trif, Otilia Zarnescu,
Magdalena Moisei, Alexandra Gaspar

Inventia se refera la un material biocompatibil poros pe baza de colagen, condroitin sulfat si compusi biologic activi din extracte vegetale (arnica si urzica) inclusi in lipozomi, destinat tratarii defectelor tesutului cartilagos (osteoartrite, artroze, inflamatii, leziuni traumatice, etc) si un procedeu de obtinere a acestuia.

Compusii utilizati in compozitia acestui biomaterial, colagenul si condroitin sulfatul sunt constituinti naturali, care intra in compozitia cartilajului articular, respectiv a matricei lui extracelulare, caracteristica ce face ca acest produs sa mimeze structura tesutului nativ. De asemenea, produsul contine compusi biologic activi (polifenoli, polizaharide), cu actiune anti-inflamatoare, inclusi in nanostructuri lipozomale, biocompatibile si biodegradabile, pentru eliberarea controlata a acestora la locul aplicarii. Lipozomii obtinuti din fosfolipide naturale, prezente in fluidul sinovial si active in procesul de lubrifiere a articulatiilor, asigura distributia uniforma a substantelor active intr-o matrice glicoproteica stabilizata. Materialul conditionat sub forma de matrice poroase asigura o structura tridimensionala, optima pentru stimularea cresterii si diferentierii condrocitelor, celule implicate in sinteza noului tesut cartilagos.

Se cunoaste ca, tesutul cartilagos articular este un tesut biologic hidratat care are ca functii de baza distribuirea stresului in zonele de rezistenta si reducerea frictiunii in timpul miscarii articulatiei. Odata lezat, cartilajul are capacitate limitata de autoregenerare datorita lipsei vaselor de sange si absentei celulelor nediferentiate pentru refacere (ANDERSON A.S., LOESER R.F., Best Practice & Research Clinical Rheumatology, 24, 15-26, 2010).

Colagenul este cea mai abundenta proteina a organismului uman, fiind componentul major al osului, cartilajului, pielii, ligamentului si tendonului. In plus, aceasta proteina formeaza o retea structurala pentru alte tesuturi, precum vasele de sange. Unitatea de baza a structurii colagenului este o peptida constand din secvente repetitive de aminoacizi Gly-Pro-Hyp, care se combina cu alte 12 peptide pentru a forma structura de tip helix a colagenului. Pana in prezent, au fost identificate in organismul uman 22 tipuri de colagen, dar cele mai raspandite sunt tipurile I, II, III si IV. Colagenul tip II este componenta principala a matricei extracelulare cartilaginoase, iar suporturile pe baza de colagen sunt un grup atractiv de materiale cu utilizari in repararea cartilajului. Acest tip de colagen este relativ usor de obtinut din tesuturi cartilaginoase animale, induce un raspuns imun foarte scazut, poate fi conditionat in diferite forme (burete tridimensional, hidrogel) si se amesteca usor cu alte componente, cu agenti reticulanti (de ex., glutaraldehida, carbodiimida) sau este supus unor tratamente fizice (iradiere UV, incalzire, liofilizare) pentru a modifica proprietatile mecanice ale suportului final.

Condroitin sulfatul este un glicozaminoglican prezent in matricea extracelulara si pe suprafata celulara a tesuturilor conjunctive animale, printre care si in tesuturile cartilaginoase. In acest tesut, condroitin sulfatul face parte din structura proteoglicanilor mari, de tipul agrecanului, cu rol in mentinerea elasticitatii matricei cartilaginoase si a proteoglicanilor mici de tipul decorinei si biglicanului, implicati in metabolismul si adeziunea condrocitelor.

Nanostructurile lipidice cunoscute si sub denumirea de nanozomi sau lipozomi, datorita compozitiei lor lipidice, a proprietatilor fizico-chimice si a compatibilitatii cu organismul viu, au calitati reale de lubrifiere a articulatiilor cartilajului si de a functiona ca transportori selectivi in procesul de eliberare controlata a medicamentelor (CASTOR T.P., Current Drug Delivery, 2, 329, 2005). Lipozomii sunt utilizati pentru introducerea in celule a substantelor farmacologic active, deoarece ei pot capta atat compusi hidrosolubili cat si hidrofilici, in compartimentul lor intern apos, cat si substante hidrofobe in bistratul lipidic (TORCHILIN V.P., Nat. Rev. Drug Discov., 4, 145-160, 2005). Majoritatea cercetarilor privind interactia lipidelor cu biopolimerii s-au limitat la asocierea lipozomilor cu ADN-ul (KHALIL I.A., KOGURE K., AKITA

H., HARSHIMA H., *Pharmacol. Rev.*, 58, 32-45, 2006), microtubuli (RAVIV U., NEEDLEMAN D. J., LI Y., MILLER H.P., WILSON L., SAFINYA C.R., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11167-11172, 2005) si substante naturale de tip glicozaminoglicani (Brevet RO 122949 B1, 2010).

Compusii biologic activi de origina vegetala de tipul polifenolilor si polizaharidelor prezinta proprietati antiinflamatoare, care au la baza capacitatea acestora de a inhiba activitatea radicalilor liberi, implicati in patogeneză diferitelor procese precum inflamatiile tesuturilor cartilajinoase, imbatranirea si cancerul (HAZRA B., BISWAS S., MANDAL N., *BMC Complem. Altern. M.*, 8, 63-65, 2008). In conditii normale, celulele articulatiilor- sinoviocitele si condrocitele, produc radicali liberi, care sunt implicati in activarea unor cascade de semnalizare intracelulare importante (ROMAN-BLAS J.A., et al., *European Journal of Pharmacology*, 623, 125-131, 2009). In conditii de poluare, productia de specii reactive de oxigen depaseste activitatea antioxidanta disponibila si se produce un dezechilibru intre oxidant si antioxidant, ceea ce conduce la stress oxidativ, un eveniment catabolic care da nastere la moartea celulara si degradarea matricei extracelulare implicate in boli degenerative ale cartilajului (osteoartrita, artrita reumatoida, etc) (MIGDAL C., SERRES M., *Medecine Sciences (Paris)*, 27, 405-412, 2011).

In ultimul deceniu, cercetarile in domeniul obtinerii de biomateriale pentru repararea cartilajului articular au capatat o importanta sporita datorita, pe de o parte, cresterii longevitatii populatiei, care a determinat o incidenta marita a osteoartritelor si osteoartrozelor si, pe de alta parte, accidentelor sporite survenite in randul populatiei tinere.

Sunt cunoscute biomaterialele utilizate la repararea cartilajului pe baza de collagen, agaroză, alginat/chitosan (GALOIS et al., *Biorheology*, 41, 433-443, 2004), singuri sau in asociere cu polimeri sintetici (polietilenglicol, poliuretani, alcool polivinilic, acid poliglicolic), care actioneaza ca o retea biocompatibila si biodegradabila in repararea cartilajului. Principalii glicozaminoglicani ai matricei extracelulare cartilajinoase – acid hialuronic si condroitin sulfat, sunt deja comercializati ca agenti condroprotectivi pentru tratamentul osteoartritei (BREVET

U.S. 5914322; PRABHAKAR V., SASISEKHARAN R., Chem. Biol., 12, 267-277, 2005). De asemenea, exista preparate comerciale continand acid hialuronic, precum HYALGAN (Fidia S.p.A.) si SYNVISIC (Biomatrix) destinate tratamentului osteoartritic prin injectare intraarticulara. Evaluarea *in vitro* a unui hidrogel compozit din acid hialuronic si alginat de calciu a evidentiat proliferarea condrocitelor din cultura si producerea de colagen tip II. Mai mult, aceste hidrogeluri implantate intr-o leziune osteocondrala de soarece au aratat o buna toleranta si o biocompatibilitate ridicata (DAUSSE Y. et al, Osteoarthritis & Cartilage, 11, 16-28, 2003).

Prezenta inventie isi propune realizarea unui produs avand in compozitie principalele componente ale tesutului cartilagos (colagen tip II, condroitin sulfat, lipozomi) si substante naturale cu efect anti-inflamator (polifenoli, polizaharide), eficient in refacerea tesutului cartilagos in procesele inflamatorii, reumatismale si leziuni traumatice.

Produsul, conform inventiei, reprezinta un material poros, biocompatibil si resorbabil, constituit din 30...40% lipozomi cationici, cu diametrul mediu cuprins intre 50...200 nm, 1...10% extract de plante ales intre arnica si/sau urzica, continand 5...20 mg/ml polifenoli si/sau 1...10 mg/ml polizaharide, 30...45% colagen tip II acido-solubil, cu greutatea moleculara medie 300...330 kDa si continut in colagen mai mare de 85% si 20...30% condroitin sulfat cu greutatea moleculara medie de 15...40 kDa si continut in acizi uronici de minim 27%, partile fiind exprimate in greutate.

Procedeul de obtinere al produsului, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza un biomaterial poros prin amestecarea a 30...60 parti compozitie I constituita dintr-o solutie de 5...15% lipozomi cationici, cu un diametru cuprins intre 50...200 nm in care s-au inglobat 1...10% extract apos de plante alese intre arnica si urzica, cu un continut de 5...20 mg/ml polifenoli si/sau 1...10 mg/ml polizaharide, cu 40...70 parti compozitie II reprezentand un amestec din 50...70% solutie vascoasa de colagen tip II nedenaturat, de concentratie 5...20 mg/ml, cu greutate moleculara medie 300...350 kDa si o solutie apoasa de 30...50% condroitin sulfat de concentratie 10...20 mg/ml cu greutatea moleculara medie 15...25 kDa si un continut in acizi uronici de 30%. Solutia de lipozomi din compozitia I se obtine prin amestecarea

fosfatidilcolina:diolileifosfatidiletanolamina:colesterol:stearilamina, in raportul de greutate 4:2:3:1, dizolvate in prealabil in 200...500 ml amestec de cloroform si metanol (95:5, parti in volume), solventi ce se evaporata ulterior la vid. Inainte de amestecarea cu compozitia II, compozitia I continand extracte vegetale inglobate in solutia de lipozomi se depoziteaza la temperatura camerei, timp de 6...9 ore si se omogenizeaza prin sonicare, intr-un sonicator tip baie, la temperatura de 37 °C, in 3...5 reprize a cate 30..60 min, urmata de sonicarea la un sonicator tip sonda, 4...6 reprize a cate 10 secunde. In vederea obtinerii unor structuri omogene de solutii lipozomi-extracte vegetale, cu diametrul mai mic de 200 nm, compozitia I se centrifugheaza la 2000...5000 rpm, timp de 5...10 min si se filtreaza prin filtrul Millipore de 0,22 µm. Indepartarea extractelor vegetale neasociate se face prin centrifugare la 10000 ...15000 rpm, timp de 30...60 min, dupa care precipitatele lipozomale se spala de 2 ori cu tampon fosfat salin pH 7,4. Colagenul tip II, utilizat in compozitia II, se obtine din cartilaj traheal bovin, prin extractie cu pepsina, in solutie de acid acetic 0,1...0,5M, la 4 °C, timp de 48...72 ore si se purifica prin precipitare cu o solutie de clorura de sodiu 0,7M urmata de o dializa excesiva fata de apa distilata. Compozitia I se adauga peste compozitia II si se amesteca prin vortexare puternica timp de 30...60 min, la temperaturi sub 30 °C, dupa care amestecul obtinut sub forma de gel se liofilizeaza prin inghetare la -20...-40 °C si uscare la +20...30 °C, timp de 36...72 ore. Materialul poros obtinut se taie la dimensiuni uniforme (diametrul 4...6 mm si grosime 3 mm), se ambaleaza in pungi de polietilena si se sterilizeaza prin expunere la radiatii gamma, la doze de 15...20 kGy.

Prezenta inventie prezinta urmatoarele avantaje:

- suportul compozit obtinut prezinta o eficienta mare in tratarea afectiunilor cartilaginoase (afectiuni inflamatorii, reumatismale, tratarea cartilajului lezat, etc) continand in compozitia sa biopolimeri care se gasesc, in mod natural, in tesutul cartilagos. Inglobarea principiilor active cu actiune antiinflamatoare in structurile lipozomale cationice permite redarea controlata si prelungita a acestora la locul aplicarii.

- Datorita structurii sale poroase, produsul realizeaza un contact strans cu zona lezata facilitand, astfel, influxul celulelor din tesutul neafectat inconjurator si proliferarea acestora.
- Produsul obtinut poate servi si ca matrice suport pentru celulele cartilajului (condrocite) oferind acestora o retea tridimensionala, asemanatoare matricei extracelulare, conditie esentiala pentru mentinerea fenotipului celular.
- Suportul este biocompatibil si biodegradabil in timp asigurand, astfel, substratul ideal pentru formarea de tesut nou in timp ce produsul este degradat.
- Produsul este stabil in timp, nu creeaza antigenicitate in contact cu organismul.
- Procedeeul de obtinere este fezabil si nu necesita instalatii cu grad ridicat de complexitate.

Exemplul 1.

Intr-un vas de inox, prevazut cu agitator, cu un volum util de 10 l, se prepara compozitia lipidica prin amestecarea a patru lipide: 60g fosfatidilcolina, 30g dioleilfosfatidil-etanolamina, 20g colesterol si 15g stearilamina, dizolvate in prealabil in 0,500 l amestec de cloroform si metanol (95:5, raport de volume). Indepartarea solventilor organici in care s-au dizolvat lipidele se realizeaza prin evaporare la vid, in atmosfera inerta de azot, intr-un vas de sticla cu fund rotund. Peste solutia lipidica din vasul de sticla se introduc 0,1 l extract apos de arnica, cu un continut de 6 mg/ml polifenoli si 5 mg/ml polizaharide si se amesteca la temperatura camerei, sub agitare continua. Pentru a facilita procesul de includere, emulsia rezultata se incubeaza la temperatura camerei, timp de 7 ore si se omogenizeaza intr-un sonicator tip baie, la 37 °C, in 3 reprize a cate 30 minute fiecare, urmata de sonicarea la un sonicator tip sonda, in 4 reprize a cate 10 secunde fiecare. Suspensia se raceste la temperatura de 5 °C, intr-o baie de gheata, timp de 30 minute si se centrifugheaza la 2000 rpm, timp de 10 minute.

In vederea obtinerii unor structuri omogene, cu particule de diametrul mai mic de 200 nm, solutia obtinuta dupa sonicare si centrifugare se filtreaza prin filtrul Millipore de 0,22 µm. Indepartarea extractelor vegetale neasociate se face prin centrifugare la 13000 rpm, timp de 60 minute, dupa care precipitatele lipozomale se

spala de 2 ori cu tampon fosfat salin, pH 7,4. Sarcina pronuntat negativa a principiilor active folosite (polifenoli, polizaharide) a permis o includere in lipozomi cu randament ridicat, peste 82%.

Separat, intr-un vas de inox, prevazut cu agitator, cu un volum util de 20 l, se obtine colagenul tip II, din cartilaj traheal bovin maruntit in prealabil, prin extractie cu pepsina, in solutie de acid acetic 0,5M, la 4 °C, timp de 48 ore. Solutia de colagen sub forma de gel se purifica prin precipitare cu o solutie de clorura de sodiu 0,7M, dupa care se dializeaza excesiv fata de apa distilata, pentru indepartarea urmelor de sare. Solutia de colagen astfel obtinuta, de concentratie 10 mg/ml, se amesteca cu o solutie de condroitin sulfat 5 mg/ml, cu greutatea moleculara medie 15 kDa si continut in acizi uronici 30%, prin agitare continua, in raport de combinare solutie de colagen:condroitin sulfat 1:1 (raport de volume).

Compozitia, obtinuta din extracte vegetale inglobate in lipozomi, se adauga peste amestecul de colagen si condroitin sulfat, in raportul de combinare 1:1 (v/v) si se vortexeaza puternic timp de 30 minute, pentru o buna omogenizare. Amestecul obtinut, sub forma de gel, se liofilizeaza prin inghetare la -40 °C si uscare la +20 °C, timp de 48 ore.

Materialul poros, obtinut dupa liofilizare, se taie la dimensiuni de 6x3 mm, se ambaleaza in pungi de polietilena si se sterilizeaza prin expunere la radiatii gamma, la doze de 15 kGy.

Exemplul 2

Se utilizeaza acelasi procedeu si instalatie ca la exemplul 1, cu deosebirea ca amestecul de lipozomi si extracte vegetale (compozitia I) se prepara din 100g compozitie lipidica si 50g extract apos de urzica. Amestecul de cloroform si metanol din compozitia lipidica se evapora la vid, iar peste solutia de lipozomi se adauga 50g extract apos de urzica, cu un continut de 20 mg/ml polifenoli si 10 mg/ml polizaharide. Dupa depozitarea compozitiei I la temperatura camerei, timp de 9 ore, se realizeaza sonicarea, cu ajutorul unui sonicator tip baie, la 37 °C, in 5 reprize a cate 40 minute fiecare. In urma centrifugarii si filtrarii acestui amestec, conform exemplului 1, se obtin structuri lipozomale, cu diametrul de 150 nm, in care sunt inglobati

polifenolii și polizaharidele din extractul de urzica. După îndepărtarea excesului de componente vegetale prin centrifugare la 15000 rpm, timp de 10 minute și spalare cu tampon fosfat salin, pH 7,4, se realizează amestecarea compoziției I cu 500g compoziție II (amestec colagen tip II și condroitin sulfat), preparată conform exemplului I. Soluția vascoasă omogenă obținută se condiționează sub formă solidă, prin liofilizare (temperatura de înghețare -35°C și temperatura de uscare $+30^{\circ}\text{C}$), timp de 36 ore. Produsul spongios, obținut după liofilizare, se ambalează etans în pungi de polietilenă, se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la o doză de 18 kGy.

Produsul obținut, conform exemplurilor de mai sus, a fost testat din punct de vedere al biocompatibilității atât *in vitro* cât și *in vivo*.

Evaluarea efectului anti-inflamator al variantelor de produs s-a realizat pe un model experimental *in vitro*, utilizând culturi primare de condrocite umane, tratate cu peroxid de hidrogen pentru inducerea de leziuni celulelor. Expunerea celulelor la peroxid de hidrogen produce apoptoza celulelor, peroxidarea lipidică, inhibă sinteza de componente ale matricei extracelulare. În acest context, s-au investigat viabilitatea celulară, proliferarea celulară și morfologia celulelor lezate și crescute în prezența produsului realizat, comparativ cu doi martori (celule netratate și celule tratate cu peroxid de hidrogen). Rezultatele obținute prin metode cantitative (spectrofotometrie) și calitative (microscopie optică) au demonstrat că produsul realizat a avut o acțiune antiinflamatoare crescută, evidențiată prin favorizarea proliferării și viabilității celulelor și păstrarea morfologiei normale a condrocitelor în cazul tratării acestora cu variantele de produs, comparativ cu celulele tratate numai cu peroxid de hidrogen care au prezentat o viabilitate redusă și o morfologie modificată.

Biocompatibilitatea *in vivo* a produsului poros a fost demonstrată pe animale de laborator (sobolani Wistar) cărora li s-au implantat subcutanat probe din produs. La 5 zile și la 6 săptămâni de la implantarea subcutanată s-a recoltat implantul împreună cu țesutul înconjurător, care a fost procesat pentru microscopie optică. Observațiile histologice au arătat că, la 5 zile de la implantare, în jurul produsului poros se formează un țesut de granulație, care conține celule inflamatorii și vase de sânge ce

apar, în mod normal, în urma unei leziuni tisulare. La 6 săptămâni de la implantare, s-a evidențiat formarea unei capsule conjunctive fibroase care înconjoară produsul. Studiile histologice au demonstrat că pe toată perioada implantării, materialul poros a fost bine tolerat de țesutul gazdă și nu determină efecte adverse, aspect care demonstrează o bună biocompatibilitate.

REVENDICARI

1. Produsul, conform inventiei, reprezinta un material poros, biocompatibil si resorbabil, constituit din 30...40% lipozomi cationici, cu diametrul mediu cuprins intre 50...200 nm, 1...10% extract de plante ales intre arnica si/sau urzica, continand 5...20 mg/ml polifenoli si/sau 1...10 mg/ml polizaharide, 30...45% colagen tip II acido-slubil, cu greutatea moleculara medie 300...330 kDa si continut in colagen mai mare de 85% si 20...30% condroitin sulfat cu greutatea moleculara medie de 15...40 kDa si continut in acizi uronici de minim 27%, partile fiind exprimate in greutate.

2. Procedul de obtinere al produsului, conform inventiei, consta in aceea ca se realizeaza un biomaterial poros prin amestecarea a 30...60 parti compozitie I constituita dintr-o solutie de 5...15% lipozomi cationici, cu un diametru cuprins intre 50...200 nm in care s-au inglobat 1...10% extract apos de plante alese intre arnica si urzica, cu un continut de 5...20 mg/ml polifenoli si/sau 1...10 mg/ml polizaharide, cu 40...70 parti compozitie II reprezentand un amestec din 50...70% solutie vascoasa de colagen tip II nederaturat, de concentratie 5...20 mg/ml, cu greutate moleculara medie 300...350 kDa si o solutie apoasa de 30...50% condroitin sulfat de concentratie 10...20 mg/ml cu greutatea moleculara medie 15...25 kDa si un continut in acizi uronici de 30%. Solutia de lipozomi din compozitia I se obtine prin amestecarea fosfatidilcolina:diolileifosfatidiletanolamina:colesterol:stearilamina, in raportul de greutate 4:2:3:1, dizolvate in prealabil in 200...500 ml amestec de cloroform si metanol (95:5, parti in volume), solventi ce se evaporata ulterior la vid. Inainte de amestecarea cu compozitia II, compozitia I continand extracte vegetale inglobate in solutia de lipozomi se depoziteaza la temperatura camerei, timp de 6...9 ore si se omogenizeaza prin sonicare, intr-un sonicator tip baie, la temperatura de 37 °C, in 3...5 reprize a cate 30..60 min, urmata de sonicarea la un sonicator tip sonda, 4...6 reprize a cate 10 secunde. In vederea obtinerii unor structuri omogene de solutii lipozomi-extracte vegetale, cu diametrul mai mic de 200 nm, compozitia I se centrifugheaza la 2000...5000 rpm, timp de 5...10 min si se filtreaza prin filtrul Millipore de 0,22 µm. Indepartarea extractelor vegetale neasociate se face prin centrifugare la 10000 ...15000 rpm, timp de 30...60 min, dupa care precipitatele

lipozomale se spala de 2 ori cu tampon fosfat salin pH 7,4. Colagenul tip II, utilizat in compozitia II se obtine din cartilaj traheal bovin, prin extractie cu pepsina, in solutie de acid acetic 0,1...0,5M, la 4 °C, timp de 48...72 ore si se purifica prin precipitare cu o solutie de clorura de sodiu 0,7M urmata de o dializa excesiva fata de apa distilata. Compozitia I se adauga peste compozitia II si se amesteca prin vortexare puternica timp de 30...60 min, la temperaturi sub 30 °C, dupa care amestecul obtinut sub forma de gel se liofilizeaza prin inghetare la -20...-40 °C si uscare la +20...30 °C, timp de 36...72 ore. Materialul poros obtinut se taie la dimensiuni uniforme (diametrul 4...6 mm si grosime 3 mm), se ambaleaza in pungi de polietilena si se sterilizeaza prin expunere la radiatii gamma, la doze de 15...20 kGy.